



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 39/295	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/30678 (43) Date de publication internationale: 2 juin 2000 (02.06.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02913 (22) Date de dépôt international: 25 novembre 1999 (25.11.99) (30) Données relatives à la priorité: 98122373.8 26 novembre 1998 (26.11.98) EP (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX MSD [FR/FR]; 8, rue Jonas Salk, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CARTIER, Jean, René [FR/FR]; 55, rue Juliot Curie, F-69005 Lyon (FR). LAROCHE, Patrick [FR/FR]; Ferme d'Arbouville, F-78120 Rambouillet (FR). (74) Mandataire: SCHAEFFER, Nathalie; Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: MULTIVALENT T.D. POLIO VACCINE AGAINST AT LEAST DIPHTHERIA, POLIOMYELITIS AND TETANUS (54) Titre: VACCIN T.D.POLIO MULTIVALENT CONTRE AU MOINS LA DIPHTERIE, LA POLIOMYELITIS ET LE TETANOS (57) Abstract <p>The invention concerns a vaccine comprising: less than 1.2 mg per ml of aluminium salt; immunogenic antigens derived from at least the poliovirus, of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> and of <i>Clostridium tetani</i>; an amount of diphtheria toxin used as immunogenic antigen of <i>Corynebacterium diphtheriae</i> between 4-16 Lf per ml. The invention also concerns the use thereof in primary vaccination and/or booster dose as well as a pharmaceutical kit comprising at least two injection doses of said vaccine.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet un vaccin comprenant: moins de 1,2 mg par ml de sel d'aluminium; des antigènes immunogènes provenant au moins du poliovirus, de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> et de <i>Clostridium tetani</i>; et une quantité d'anatoxine diphtérique utilisée comme antigène immunogène de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> comprise entre 4-16 Lf par ml, son utilisation en primo-vaccination et/ou en vaccination de rappel et concerne également un Kit pharmaceutique comprenant au moins 2 doses injectables dudit vaccin.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Vaccin T.d.Polio multivalent contre au moins la diphtérie, la poliomyélite et le tétanos

La présente invention concerne un nouveau vaccin multivalent contre au moins la diphtérie, la poliomyélite et le tétanos, destiné à être utilisé en primo-vaccination et comme rappel vaccinal chez une personne déjà primo-vaccinée ou sensibilisée.

État de la technique

10

La diphtérie est due à *Corynebacterium diphtheriae*. La transmission est essentiellement directe par les voies respiratoires. Les manifestations cliniques de la forme respiratoire relèvent de deux mécanismes. La prolifération des bactéries au niveau de la porte d'entrée détermine la symptomatologie locale, habituellement pharyngée (angine pseudo-membraneuse), parfois laryngée (croup). La diffusion de l'exotoxine de certaines souches est responsable d'angine maligne et/ou de complications viscérales (polynévrite, myocardite, syndrome malin de Marfan). De nombreuses études sérologiques, réalisées récemment dans la plupart des pays développés, ont montré que, selon l'âge, le sexe et l'histoire épidémique ou vaccinale locale, 20 à 80 % des habitants ne sont plus aujourd'hui correctement immunisés ; et que les sujets de plus de 50 ans et les sujets féminins sont particulièrement vulnérables (Rappuoli *et al.*, Vaccine 11, 576-577, 1993. Simonsen *et al.*, Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand, 95, 225-231, 1987. Wirz *et al.*, Vaccine, 13, 771-773, 1995). Cette vulnérabilité est révélée ces vingt dernières années par la résurgence, parfois dramatique de la diphtérie dans les pays développés (Galazka *et al.*, Eur. J. Epidemiol, 11, 107-117, 1995).

Le tétanos est dû à *Clostridium tetani*. La forme sporulée, essentiellement tellurique, introduite par effraction dans l'organisme (blessure, piqûre, brûlure ou plaie mineure), donne naissance à la forme végétative. Cette forme sécrète une endotoxine, la tétanospasmine. La lyse bactérienne provoque sa diffusion. Neurotrope, la toxine détermine la symptomatologie, c'est-à-dire un trismus inaugural et des contractures musculaires. Sans traitement, l'évolution est fatale par asphyxie ou syncope. La vaccination par anatoxine reste la seule parade. L'immunité acquise par primo-vaccination décroît avec le temps et nécessite des rappels. L'absence ou la perte avec l'âge de l'immunité a été notée dans la population américaine depuis des décennies par plusieurs enquêtes sérologiques (Hilton *et al.*,

Ann. Intern. Med., 115, 32-33, 1991). En Europe, des enquêtes sérologiques ont donné des résultats équivalents (Kjeldsen *et al.*, Scand. J. Infect. Dis., 20, 177-185, 1988). Il est donc clair que de nombreux adultes, particulièrement les plus de 50 ans et les femmes, sont redevenus ou ont toujours été vulnérables au tétanos et nécessitent une vaccination par anatoxine.

La poliomyélite est due au poliovirus, appartenant au groupe des entérovirus. Il existe trois sérotypes, dénommés type 1, type 2 et type 3. La transmission est essentiellement fécale-orale, directe ou indirecte, et parfois orale-orale. Le virus est doué d'un tropisme intestinal, musculaire, méningé et nerveux. L'infection est, en général inapparente ou fruste. Cette "poliomyélite-infection" est immunisante, mais sans immunité croisée entre les types, et contagieuse pendant plusieurs semaines. Elle suscite exceptionnellement (1 ‰ à 1 % des infections selon l'âge et le type) des formes méningées ou paralytiques (paralysie flasque aiguë). Cette "poliomyélite-maladie" est toujours grave car il n'existe pas de traitement curatif étiologique. Lorsqu'elle n'est pas mortelle par asphyxie (2 à 10 % selon l'âge et le type), elle est suivie de séquelles musculaires ou ventilatoires invalidantes. Les échanges humains, toujours plus nombreux, entre les pays d'endémie et les pays indemnes de poliomyélite, exposent ces derniers aux risques d'importation et de ré-introduction de souches sauvages. Ces dernières années, en dépit d'un niveau élevé de couverture vaccinale et d'une très faible incidence globale de la maladie, des cas importés et des épidémies sont apparus en Europe, en Amérique du Nord et au Moyen-Orient (OMS, Relevé Epidémiologique Hebdomadaire, 29, 220-221, 1996). En attendant une élimination de la maladie, les nombreux échanges humains entre les pays d'endémie et les pays indemnes risquent donc de provoquer dans n'importe quelle région du monde des flambées dues à des souches sauvages importées. Afin de réduire au minimum la propagation de la maladie lors de poussées de ce type, il importe que tous les pays, y compris ceux où plus aucun cas de poliomyélite aiguë n'est signalé, maintiennent un taux élevé de couverture vaccinale dans toute leur population.

Mis au point par Ramon dans les années 1930, les vaccins diphtérique et tétanique sont à base d'anatoxines. Elles peuvent être obtenues par l'action détoxifiante du formaldéhyde sur un concentré de culture de *Corynebacterium diphtheriae* ou de *Clostridium tetani*, puis purification. Leurs activités immunisantes respectives sont appréciées *in vitro* et *in vivo*. Un test de floculation mesure la quantité d'anatoxine, exprimée en unité de floculation (Lf) par dose (Lyng *et al.*, J. Biol. Stand., 15, 27-37, 1987 ; J. Lyng, Biologicals, 18, 11-17, 1990)

L'anatoxine tétanique est parfois administrée seule. Cependant, cette anatoxine est historiquement toujours combinée, au moins à l'anatoxine diphtérique. En général, la primo-vaccination tétanique et diphtérique est effectuée au cours de la première année de vie en 3 doses (OMS, WHO/EP/GEN, 95.3, 1995). Selon les pays, une dose de rappel est administrée au cours de la deuxième année et/ou entre 4 et 10 ans. Parfois, un rappel est également effectué entre 11 et 18 ans. En outre, l'OMS recommande, depuis 1987, de vacciner par anatoxine tétanique les femmes en âge de procréer dans les pays en développement, par 3 doses primo-vaccinales puis 1 dose de rappel 1 et 5 ans après.

La quantité d'anatoxine tétanique (T) par dose vaccinale varie selon les pays de 5 à 20 Lf pour une dose de 0,5 ml en primo-vaccination ou en rappel. La Pharmacopée Européenne recommande une activité d'au moins 20 UI.

La quantité d'anatoxine diphtérique (D) par dose vaccinale la plus largement et la plus anciennement administrée est celle qui existe dans les combinaisons primo-vaccinales pédiatriques : elle varie de 12 à 50 Lf pour une dose de 0,5 ml (Galazka *et al.*, Vaccine, 14, 845-857, 1996).

Pour un rappel vaccinal, la réduction de la quantité d'anatoxine diphtérique (d) s'est maintenant aussi généralisée. La quantité est généralement de l'ordre de 1/10 de la quantité pédiatrique. Elle est ainsi fixée à 2 Lf pour une dose de 0,5 ml aux US et au Canada, et est recommandée en rappel à partir de l'âge de 7 ans (Edsall *et al.*, Am. J. Hyg, 53, 283-295, 1951). En Europe, la quantité d'anatoxine et l'âge inférieur d'administration changent selon les pays. La quantité n'est pas fixée pour la raison que la seule condition imposée par la Pharmacopée Européenne porte non pas sur la quantité mais sur l'activité : elle doit être au moins de 2 UI par dose de 0,5 ml.

Pour les vaccins de rappel destinés à une population adulte, l'anatoxine diphtérique est généralement aussi combinée à l'anatoxine tétanique. Il est connu que cette combinaison réduit quelque peu la tolérance de l'anatoxine tétanique seule (Palmer *et al.*, Br. Med. J., 286, 624-626, 1983). Aux Etats-Unis, les rapports d'événements indésirables liés aux vaccins T et Td administrés chez les sujets de plus de 7 ans ont été récemment analysés (Haber *et al.*, ICAAC, 1996). Le vaccin Td a exposé davantage que le vaccin T à une réaction locale, une dyspnée, une perte de connaissance ou une convulsion.

Pour ce qui concerne la poliomyélite, deux vaccins ont été mis au point dans les années 1950 : le vaccin injectable (VPI), inactivé au formaldéhyde, développé par Salk (Plotkin et al., E.A. Vaccines, ed. Raven Press, 1994), et le vaccin oral (VPO), vivant atténué, développé par Sabin (Plotkin et al., *supra*). Le VPI a permis à tous les pays d'éliminer la poliomyélite, tant sauvage que postvaccinale (Murdin et al., Vaccine, 14, 735-746, 1996). Le mode de production et la composition du VPI varie selon les pays. Les trois types de poliovirus sont ainsi cultivés sur lignée cellulaire continue VERO, puis purifiés et inactivés par le formaldéhyde. Leur activité immunisante respective est appréciée *in vitro* et *in vivo*. Un ELISA mesure la teneur en antigène viral, exprimée en unités internationales : l'OMS recommande par dose de 0,5 ml 40 UI, 8 UI et 32 UI (telles que déterminées par la méthode sigmoïde) respectivement pour les antigènes D des types 1, 2 et 3.

Le VPI offre deux avantages pharmaceutiques : il est stable et ne nécessite pas de logistique particulière. Il peut être parfois combiné à d'autres antigènes.

La vaccination simultanée pendant l'enfance contre la poliomyélite, le tétanos et la diphtérie est une pratique courante depuis des années dans le monde entier, voire depuis des décennies dans la plupart des pays développés. Cette pratique a fortement contribué à la réduction considérable du nombre de cas et de morts dus à ces trois maladies. Cependant, elles n'ont pas disparu. Dans les pays développés, lorsqu'elles surviennent, elles sont d'autant plus graves qu'elles sont plus tardives. Or l'immunité acquise par vaccination s'atténue avec le temps. Puisqu'ils ne bénéficient pas d'un entretien naturel de cette immunité, les adolescents et les adultes de ces pays redeviennent vulnérables. Le maintien de la couverture vaccinale contre chacune des trois maladies tout au long de la vie est désormais une obligation épidémiologique.

Il existe donc un besoin pour un nouveau vaccin contre au moins la diphtérie, la poliomyélite et le tétanos utilisable en primo-vaccination et en rappel vaccinal, qui viserait à conférer une protection contre le tétanos, la poliomyélite et la diphtérie, et/ou à prolonger une protection conférée initialement lors d'une primo-vaccination ou une sensibilisation, et qui minimiserait sur cette population les effets indésirables induits par les vaccins existants.

Les vaccins pédiatriques injectables du genre TDPolio (T : anatoxine tétanique ; D : dose classique d'anatoxine diphtérique ; Polio : poliovirus inactivés

types 1, 2 et 3), par exemple le vaccin D.T.Polio® (PMsv S.A., France) ne peuvent satisfaire ce besoin. En effet, ces types de vaccin sont utilisés principalement en primo-vaccination pédiatrique. Ils sont dépourvus de sels d'aluminium. Ils contiennent des quantités trop importantes d'anatoxine diphtérique, de l'ordre de 100 Lf /ml, par exemple. Et ils déclenchent des réactions indésirables chez l'adulte (Björkholm *et al.*, Eur. J. Clin. Microb., 6, 637-640, 1987).

On ne peut aussi envisager de simplement modifier un vaccin TDPolio existant afin d'en minimiser les effets indésirables sur une population primo-vaccinée. En effet, une cible de choix serait par exemple d'y réduire la quantité d'anatoxine diphtérique. Dans ce cas, on n'envisagerait pas de retenir les quantités d'anatoxine utilisées classiquement dans un vaccin Td (qui est la seule référence actuelle), de l'ordre d'au moins 4 Lf par ml, par exemple, mais plutôt dans mettre plus, probablement plus de 20 Lf/ml, par exemple. En effet, dans un vaccin Td classique l'anatoxine diphtérique est toujours adjuvantée par un sel d'aluminium, ce qui renforce son immunogénicité. Dans un vaccin TDPolio, le fait de ne pas avoir d'adjuvant implique de renforcer la dose d'anatoxine par rapport à celle utilisée dans un vaccin Td.

Pour les mêmes raisons, la simple combinaison d'un vaccin existant du genre Td injectable, par exemple les vaccins vaccinol® ou Td-Pur® (Chiron-Behring GmbH, Allemagne) ou le vaccin Diftavax® (PMsv S.A., France), avec un vaccin classique contre la poliomyélite (PMsv, France), ne pourrait, non plus, conduire à une solution satisfaisante. En effet, le choix de chaque constituant dans un tel vaccin, ainsi que leur dosage, sont déterminants pour l'obtention d'une réponse immunitaire optimale, et une minimisation des effets indésirables.

Ainsi par exemple si l'on rajoute de nouveaux antigènes (Polio) à un vaccin Td, la quantité de sels d'aluminium est alors susceptible d'être insuffisante pour jouer un rôle adjuvant optimal. L'immunogénicité d'un tel vaccin risquerait d'être ainsi réduite. Par contre, si l'on veut pallier ce problème en augmentant la quantité de sels d'aluminium, on risquerait parallèlement d'aggraver les réactions indésirables liées à ces sels (1,2 à 3 mg par ml dans les vaccins Td ; Gupta *et al.*, Vaccine, 13, 1263-1276, 1995).

De même, si l'on rajoute de nouveaux antigènes (Polio) à un vaccin Td, on diminue aussi la charge relative de chaque antigène T ou d. L'immunogénicité d'un

tel vaccin risquerait d'être ainsi aussi réduite. Par contre, si l'on veut pallier ce problème en augmentant le dosage de chaque antigène, notamment celui de l'anatoxine diphtérique, on risquerait parallèlement d'aggraver les réactions indésirables liées à cette anatoxine (Björkholm *et al.*, Eur. J. Clin. Microb., 6, 637-640, 1987).

Le choix de chaque constituant d'un vaccin du type TdPolio, ainsi que leur dosage, sont donc difficiles à cerner, et ne peuvent être déduit aisément des vaccins existants.

Il n'existe pas non plus une combinaison vaccinale, appropriée pour une utilisation comme rappel vaccinal chez l'adulte ou l'adolescent, contre la diphtérie, le tétanos, la poliomyélite et la coqueluche, voire même aussi contre l'hépatite A et/ou l'hépatite B.

La présente invention vise ainsi à fournir un vaccin ayant au moins la combinaison de base TdPolio, qui, tout en se distinguant des vaccins TDPolio, Td et Polio précédents, présente une immunogénicité comparable à ceux-ci et en plus minimise leurs effets indésirables. Le vaccin selon l'invention présente l'avantage d'être utilisable en primo-vaccination et en vaccination de rappel.

Résumé de l'invention

A cet effet, l'invention concerne un vaccin comprenant :

- moins de 1,2 mg par ml de sel d'aluminium, exprimé par rapport à l'atome d' Al^{3+} ,
- des antigènes immunogènes provenant au moins du poliovirus, de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani*, et
- une quantité d'anatoxine diphtérique utilisée comme antigène immunogène de *Corynebacterium diphtheriae* comprise entre 4-16 Lf par ml.

Le vaccin selon la présente invention est utilisable en primo-vaccination et comme vaccin de rappel chez une population primo-vaccinée ou sensibilisée. La demanderesse a mis en évidence que le vaccin tel que défini ci-dessus est particulièrement bien approprié pour une utilisation comme rappel vaccinal.

La demanderesse a mis en évidence de façon surprenante que le vaccin tel que défini ci-dessus, permet de minimiser les effets réactogènes et/ou allergiques induits par les antigènes constitutifs.

5 Selon un autre objet, la présente invention concerne une méthode de vaccination contre au moins le poliovirus, *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani* comprenant l'administration d'un vaccin tel que défini ci-dessus.

10 Enfin l'invention concerne également un kit pharmaceutique comprenant au moins 2 doses injectables d'un vaccin selon la présente invention.

Description détaillée de l'invention

15 Dans le contexte de la présente invention, on entend par l'expression « une population déjà primo-vaccinée ou sensibilisée », des personnes adultes, adolescentes ou juvéniles ayant déjà été vaccinées contre au moins le poliovirus, *Corynebacterium diphtheriae* et/ou *Clostridium tetani*, ou des personnes ayant déjà été en contact avec l'un au moins des germes poliovirus, *Corynebacterium diphtheriae*, et *Clostridium tetani* ; la population préférée étant constituée par les adolescents et les
20 adultes, et plus particulièrement les personnes âgées.

25 De préférence, les antigènes de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani* ont pour origine leurs toxines, qui sont détoxifiées par le formaldéhyde puis purifiées. Les techniques de détoxification et de purification de ces toxines sont bien
30 connues depuis des décennies et sont incorporées par référence dans la description de la présente invention, telles que celles décrites par Leong *et al.*, Science, 220, 815-517, 1983; Ramon G., Ann. Inst. Pasteur, 38, 1-105, 1924; Raynaud *et al.*, Ann. Inst. Pasteur, 96, 60-71, 1959 ; ou par Bizzini *et al.*, Eur. J. Biochem., 17, 100-105, 1970, par exemple. Les analogues détoxifiés pouvant être produits par génie génétique sont également compris dans la présente invention.

35 De même, les antigènes du poliovirus peuvent être constitués simplement par un ou plusieurs types de poliovirus inactivé (voir ci-après) et/ou par des antigènes immunogènes purifiés du poliovirus tels que ceux décrits par Delpeyroux *et al.*, 70, 1065-73, 1988 ; EP323861 (Pasteur Institut) ; EP86707 (Pasteur Institut) ; ou dans EP65924 (Pasteur Institut), par exemple.

Pour obtenir des poliovirus inactivés, on peut les cultiver sur des lignées cellulaires VERO, les purifier, puis les détoxifier avec du formaldéhyde, par exemple. Les techniques de culture et de détoxification du poliovirus sont bien connues depuis des décennies et sont aussi incorporées par référence dans la description de la présente invention, telles que celles décrites dans WO9800167 (Connaught); Dulbecco, Nature, 376, p.216, 1995; Cohen, Acta Leiden, 56, 65-83, 1987, et par Salk, Dev Biol Stand., 47, 247-55, 1981, par exemple.

De préférence, on utilise les poliovirus inactivés types 1 (souche MAHONEY), 2 (souche MEF 1) et 3 (souche Saukett).

La quantité d'anatoxine diphtérique utilisée par dose vaccinale comme antigène immunogène de *Corynebacterium diphtheriae* doit être comprise entre 4 à 16 Lf par ml, de préférence 6-14 Lf, notamment de l'ordre de 10 Lf par ml, par exemple. Cette quantité permet d'assurer une immunogénicité optimale, tout en minimisant les effets indésirables, comme les réactions réactogènes ou allergiques aux antigènes, par exemple.

De même la quantité d'anatoxine tétanique par dose vaccinale comme antigène immunogène de *Clostridium tetani* est comprise entre 6 à 30 Lf par ml, de préférence 8-20 Lf, notamment de l'ordre de 10 Lf par dose, par exemple. Cette quantité permet d'assurer une immunogénicité optimale, tout en minimisant les effets indésirables.

Pour mesurer la quantité d'anatoxine diphtérique ou tétanique (Lf), on utilise le test de floculation décrit par Lyng (J. Biol. Stand., 15, 27-37, 1987; ou Biologicals, 18, 11-17, 1990) ou l'OMS (Manual for the production and the control of vaccines, BLG/UNDP/77.1 et BLG/UNDP/77.2), en prenant en compte toutefois que l'on rapporte la pureté de l'anatoxine utilisée à 1500-1800 Lf par mg d'azote pour la diphtérie, ou 1000-1300 Lf par mg d'azote pour le tétanos.

A titre d'indication, dans la plupart des productions, la pureté de l'anatoxine diphtérique purifiée est généralement de l'ordre de 1700-1800 Lf par mg d'azote (source interne). De même, pour l'anatoxine tétanique, cette pureté est de l'ordre de 1200-1400 Lf (source interne).

En ce qui concerne les poliovirus inactivés utilisés comme antigènes immunogènes, une dose vaccinale selon l'invention peut comprendre 60-120 UI/ml d'antigène D du poliovirus type 1, 8-30 UI/ml d'antigène D du poliovirus type 2, et/ou 16-80 UI/ml d'antigène D du poliovirus type 3, par exemple. Les Unités Internationales sont déterminées selon la méthode Sigmoide.

Dans un mode d'application particulier de la présente invention, le vaccin selon l'invention peut comprendre, en outre de la combinaison de base TdPolio décrite ci-dessus, 0,1 à 60 µg/ml des antigènes purifiés de *B. pertussis*, de préférence anatoxine de *B. pertussis* (PT) et F-HA ; 0,1 à 40 µg /ml de l'antigène HBs de l'hépatite B ; et/ou 0,1 à 40 µg/ml de virus hépatite A inactivé ou un antigène de celui-ci, par exemple.

La toxine de *Bordetella pertussis*, y compris les analogues détoxifiés produits par génie génétique, peut être produite de différentes manières. Par exemple, on peut cultiver une souche de *B. pertussis* selon des méthodes traditionnelles (Sekura *et al.*, J.Biol. Chem., 258, 14647-14651, 1993), on peut isoler l'anatoxine en adsorbant le milieu de culture sur une colonne Affi-Gel Blue® (Bio-Rad Lab, US), puis en l'éluant avec une solution riche en sels (par exemple 0,75 M de chlorure de magnésium), puis après avoir ôter les sels, on peut encore ensuite adsorber cet éluat sur une colonne d'affinité fétuin-Sépharose (composé de fétuin lié à du bromure de cyanogène) puis l'éluer avec une solution 4M d'un sel de magnésium. La toxine de *B. pertussis* peut être ensuite détoxifiée à l'aide du glutaraldéhyde selon une méthode modifiée de Munoz *et al.* (Infect. Immun., 33, 820-826, 1981) comme décrit dans la demande de brevet PCT/EP97/05378 (PMsv). De nombreuses autres méthodes sont encore à la disposition de l'homme du métier, comme celles de Irons *et al.* (Biochem. Biophys. Acta, 580, 175-185, 1979), ou celles décrites dans les brevets US4705686 et EP336736, et sont incorporées par référence dans la description de la présente invention.

30

La F-HA peut être purifiée à partir du surnageant de culture essentiellement par le procédé décrit par Cowell et al (Infect. and Immun., 41, 1, 313-320, 1983). Des promoteurs de croissance, tels que les bêta-cyclodextrines méthylées, peuvent être utilisés pour augmenter le rendement en F-HA dans le surnageant. Le surnageant de culture est chargé sur une colonne d'hydroxylapatite. La F-HA est adsorbée sur la colonne, mais pas la PT. La colonne est très largement lavée au Triton X-100 pour supprimer l'endotoxine. La F-HA est ensuite éluee par utilisation de 0,5M NaCl dans

35

du phosphate de sodium 0,1M et, si nécessaire, passée dans une colonne de fétuine-Sephadex pour éliminer la PT résiduelle. Une purification supplémentaire peut comprendre le passage au travers d'une colonne de Séphadex CL-6B. Une alternative peut comprendre la purification de la F-HA par utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène, dans laquelle les anticorps sont fixés à une colonne d'affinité activée au CNBr. La F-HA peut également être purifiée par utilisation d'une chromatographie sur perlite, comme cela est décrit dans le brevet EP 336 736.

Une méthode appropriée pour la purification de la F-HA est également décrite à l'exemple 3 du brevet EP 0242 302. Dans le cadre de la présente invention, la F-HA est préparée selon cette méthode.

On peut produire une suspension de l'antigène de l'hépatite B selon la méthode décrite dans le brevet EP273811 (Pasteur Vaccins), dans laquelle on produit des particules antigéniques de surface de l'hépatite B par expression à partir d'une culture de cellules CHO transfectées par un plasmide portant le gène HBsAg de façon à libérer les particules de surface antigéniques dans le milieu de culture. D'autres techniques sont bien connues de l'homme du métier et sont incorporées par référence dans la description de la présente invention, telles que celles décrites dans EP864649, UE56711 ou IE48665, par exemple.

De même on peut produire un virus de l'hépatite A inactivé selon le protocole de Flehmig *et al.* (Viral Hepatitis and Liver Disease, 87-90, 1988 ; J. Med. Virol., 22, 7-16, 1987). D'autres techniques sont bien connues de l'homme du métier et sont incorporées par référence dans la description de la présente invention, telles que celles décrites par Wang *et al.*, Vaccine, 13, 835-40, 1995 ; Shevtsova *et al.*, Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol., 2, 55-90, 1995 ; Richtmann *et al.*, J. Med Virol., 48, 147-50, 1996 ; EP199480 ; IE48399 ; ou dans IE50191, par exemple.

Le vaccin selon l'invention comprend un ou plusieurs adjuvants choisis parmi les adjuvants reconnus comme tels, notamment tous les sels d'aluminium, comme les phosphates et hydroxydes d'aluminium ; le N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanine-2-[1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-(hydroxyphosphoryloxy)] (voir Sanchez-Pescador *et al.*, J. Immu., 141, 1720-1727, 1988) ; les molécules dérivées de *Quillaja saponaria*, comme le Stimulon® (Aquila, US) ; l'Iscoms® (CSL Ltd, US) ; toutes molécules à base cholestérol et analogues, comme

le DC Chol® (Targeted Genetics) ; le glycolipide Bay R1005® (Bayers, DE) ; les antigènes de *Leishmania brasiliensis* comme le LeIF (nom technique) disponible auprès de Corixa Corp. (US), les polymères de la famille de polyphosphazènes, comme l'Adjumer (nom technique) disponible auprès du «Virus Research Institute »
5 (US), par exemple. Le vaccin selon la présente invention contient moins de 1,2 mg/ml, de préférence, 0,70 mg/ml de sel d'aluminium, exprimé par rapport à l'atome Al^{3+} .

On peut remarquer que, par rapport aux vaccins TDPolio classique, comme le
10 D.T. Polio® (PMsv, France), la présente invention propose pour la première fois l'adjonction d'un adjuvant, et notamment un sel d'aluminium, comme l'hydroxyde d'aluminium, par exemple.

Contre toute attente, le vaccin selon la présente invention peut comprendre
15 une quantité de sel d'aluminium plus faible que celles rencontrées dans tous les vaccins Td classiques, comme le Td-Pur® ou Diftavax®, alors que l'on aurait pu estimer nécessaire d'en augmenter la charge suite à l'adjonction des poliovirus inactivés. Un vaccin selon la présente invention comprend moins de 1,2 mg/ml d'un sel d'aluminium, de préférence moins de 0,8 mg/ml. La quantité de sel d'aluminium
20 est toujours exprimée par rapport à l'atome d'aluminium (Al^{3+}); ce qui correspond à la seule méthode utilisable dans le domaine des vaccins. Toutes les quantités de sel d'aluminium auxquelles il est fait référence dans la présente demande sont donc exprimées de cette manière.

25 Un vaccin selon la présente invention peut comprendre d'autres constituants, comme des agents conservateurs tels que le 2-phénoxyéthanol et/ou le formaldéhyde, etc., par exemple.

Les différentes formulations retenues peuvent être l'une de celles décrites ci-dessus, par exemple, notamment celles comprenant d'autres antigènes provenant de
30 *Bordetella pertussis*, de l'hépatite A ou de l'hépatite B.

Le vaccin selon l'invention peut se présenter sous la forme d'une suspension injectable, faiblement opalescente du fait de la présence d'un sel d'aluminium
35 insoluble. La dose vaccinale est de préférence de l'ordre de 0,5 ml, contenue dans une seringue en verre pré-remplie. L'administration est effectuée par voie sous-

cutanée profonde ou par voie intramusculaire, de préférence par voie intramusculaire, par exemple dans l'un des muscles deltoïde.

5 Dans un mode d'application particulier de la présente utilisation, plusieurs doses de vaccin sont destinées à être injectées séparément à un même sujet dans un intervalle de temps compris entre 10 jours à 3 mois, de sorte à favoriser une réaction immunitaire optimale, et de sorte à minimiser les effets réactogènes et/ou allergiques de ces antigènes. Pour une primo-vaccination, le vaccin selon la présente invention est de préférence administré à raison de 3 doses, les deux premières doses étant
10 administrées à un intervalle de 1 à 2 mois, la troisième dose étant séparée de la deuxième injection par un intervalle de 6 à 12 mois. Pour une vaccination de rappel utilisable sur une population primo-vaccinée ou sensibilisée, le vaccin selon la présente invention est administré à raison de 1 dose, ou de 2 doses séparées d'au moins 1 mois.

15 Le vaccin selon la présente invention peut avantageusement être utilisé dans une vaccination de rappel dans laquelle la primo-vaccination a été réalisée à l'aide d'un vaccin oral contre la poliomyélite.

20 On utilise, tant en primo-vaccination qu'en vaccination de rappel de préférence une dose de 0,5 ml comprenant 4 à 16 Lf/ml d'anatoxine diphtérique, de préférence 10 Lf/ml ; 6 à 30 Lf/ml d'anatoxine tétanique, de préférence 20 Lf/ml et respectivement et de préférence 40 UI, 8 UI et 32 UI (méthode sigmoïde) des antigènes D du poliovirus 1, 2 et 3. La quantité de sel d'aluminium présente étant de
25 préférence de 0,70 mg/ml exprimée par rapport à l'atome Al^{3+} .

Le vaccin selon l'invention permet de diminuer les effets indésirables induits par les vaccins TDPolio et Td existants lorsqu'ils sont injectés. On peut ainsi observer une diminution des réactions locales comme un engourdissement des
30 membres, des sueurs, de la fièvre, des douleurs associés à des rougeurs, des nodules, indurations et/ou ecchymoses, et une diminution des dyspnées, pertes de connaissance ou convulsions, par exemple. Ces réactions peuvent être classées parmi les réactions allergiques, voire réactogènes, aux antigènes et/ou à un certains autres composés du vaccin, tel que le sel d'aluminium. La demanderesse a ainsi montré que
35 le vaccin selon la présente invention est particulièrement approprié pour une vaccination de rappel, notamment chez les sujets adultes.

La présente invention est décrite plus en détail dans les exemples présentés ci-après. Les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire. Il va de soi, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

5

Exemple 1 Immunogénicité du TdPolio avec différentes doses d'anatoxine diphtérique

On prépare de l'anatoxine diphtérique (d) en cultivant la souche IM 1514 N3S dans un milieu IMD pendant 15 à 18 h à 36°C, en centrifugeant le milieu, en le clarifiant, en le concentrant par ultrafiltration, en le détoxifiant à 37°C pendant 4 semaines en présence de 6/1000 de formaline, puis en purifiant la toxine jusqu'à atteindre une pureté de l'ordre de 1700 Lf par mg d'azote.

Parallèlement, on prépare de l'anatoxine tétanique (T) en cultivant la souche Harvard N°49205 IM 1472C dans un milieu Massachusetts à 35°C pendant 4 jours, en y ajoutant du NaCl et citrate de sodium, en centrifugeant le milieu, en le concentrant par ultrafiltration, en le détoxifiant pendant 2 semaines à 35°C en présence de 5,5/1000 de formaline et 5 g/l de bicarbonate de sodium, puis en purifiant la toxine jusqu'à atteindre une pureté de l'ordre de 1200 Lf par mg d'azote.

20

De même, on prépare les poliovirus inactivés types 1 (souche MAHONEY), 2 (souche MEF 1) et 3 (souche Saukett), selon la méthode Salk.

On mélange ensuite les 5 antigènes immunogènes ci-dessus avec de l'hydroxyde d'aluminium, du 2-phénoxyéthanol, du formaldéhyde, du milieu 199 de Hanks exempt de rouge de phénol et de l'eau. Pour ce faire, on stérilise le gel d'aluminium en présence d'eau, on ajuste le pH entre 5,6 et 6, on ajoute séquentiellement l'ADP (2 ou 8 Lf/dose) et l'ATP (10 Lf/dose), le milieu 199 de Hanks, on ajuste le pH à 6-6,9, on ajoute les trois types de poliovirus, puis on ajoute le 2-phénoxyéthanol et le formaldéhyde et éventuellement on ajuste le pH entre 6,8 et 7.

Le produit final de 0,5 ml servira de vaccin TdPolio, et contient au minimum 2 UI d'anatoxine diphtérique, au minimum 20 UI d'anatoxine tétanique purifiée, 40 UI, 8 UI et 32 UI d'antigène D (valeurs telles que mesurées par la méthode sigmoïde) respectivement pour les poliovirus inactivés du type 1, 2 et 3, 0,35 mg d'hydroxyde d'aluminium exprimé par rapport à l'atome d'aluminium Al^{3+} , 2,5 µl de

2-phénoxyéthanol, 12,5 µg de formaldéhyde ; le reste étant constitué de milieu 199 de Hanks exempt de rouge de phénol et d'eau.

5 Une étude de phase I, a eu comme principal objectif de valider la tolérance clinique et biologique de la première administration d'un vaccin TdPolio adsorbé. Dans ce but, 31 adultes volontaires sains ont été recrutés. Trois lots du vaccin de 0,5 ml chacun ont été utilisés. Ils ne différaient que par la quantité d'anatoxine diphtérique purifiée décrite ci-dessus: 2Lf, 5Lf et 8 Lf par dose. Ils ont été attribués séquentiellement à raison de 10 sujets par lot. Chaque sujet a été vacciné par une
10 dose d'un lot injectée dans un muscle deltoïde.

Aucune réaction générale n'a été rapportée dans les groupes vaccinés par les lots à 2, 5 et 8 Lf. Au moins une réaction locale a été rapportée au cours de la première semaine chez 8 sujets du groupe vacciné par le lot à 2 Lf d'ADP, chez
15 6 sujets du groupe vacciné par le lot à 5 Lf d'ADP et chez 8 sujets du groupe vacciné par le lot à 8 Lf d'ADP, il s'agissait toujours de douleurs, associées à quelques rougeurs, nodules, indurations et/ou ecchymoses. Toutes les réactions ont disparu sans traitement et n'ont pas modifié la vie courante des sujets. Aucune réaction n'est survenue au-delà de la première semaine. Aucun événement indésirable grave n'a été
20 déclaré par les investigateurs.

Cette étude a eu aussi comme objectif secondaire d'évaluer l'immunogénicité des trois premiers lots du vaccin adsorbé. Les résultats montrent que la réponse immunitaire aux cinq antigènes a été excellente pour les trois lots. En dépit de titres
25 initiaux élevés dus au jeune âge des sujets et à des vaccinations récentes, un effet rappel a été obtenu pour chaque antigène.

Exemple 2 Immunogénicité chez le jeune adulte

30 L'immunogénicité et l'innocuité d'un vaccin TdPolio a été déterminée pendant un essai clinique chez 508 jeunes adultes.

Pour chaque sujet, une dose de 0,5 ml d'un vaccin Td (Diftavax®) ou TdPolio a été injectée dans le muscle deltoïde gauche, et une dose de 0,5 ml du
35 vaccin contre la poliomyélite (VPI®, PMsv) ou un placebo a été injecté dans le muscle deltoïde droit. Une dose de vaccin adsorbé Td contient de l'anatoxine tétanique (activité ≥ 20 IU), de l'anatoxine diphtérique (activité ≥ 2 IU) de

l'hydroxyde d'aluminium ($\leq 1,25$ mg). Le vaccin VPI contient les antigènes D des poliovirus du type 1 (40 UI), 2 (8 UI) et 3 (32 UI). Le placebo a la même composition que le VPI à la différence près qu'il ne contient pas d'antigènes D. Le vaccin TdPolio a la même composition que celle décrite à l'exemple 1 (5 Lf d'ADP par dose).

Les anticorps anti-diphtérie, tétanos et poliomyélite sont déterminés à partir des sérums des sujets par test ELISA.

Les résultats montrent qu'avant vaccination quasiment tous les sujets étaient séropositifs en ce qui concerne l'ADP (99,2% ont un titre $\geq 0,01$ UI/ml : protection possible ; et 92,6% ont un titre $\geq 0,1$ UI/ml : protection assurée). Un mois après la vaccination avec le TdPolio, 99,6% des sujets avaient un titre d'anticorps $\geq 0,1$ UI/ml et 82,4% un titre ≥ 1 UI/ml (protection à long terme). Au total, 17,4% des sujets ont présenté une séroconversion.

De même, la majorité des sujets étaient séropositifs en ce qui concerne l'anatoxine tétanique (99,6% ayant un titre $\geq 0,01$ UI/ml : protection possible ; et 98,4% ayant un titre $\geq 0,1$ UI/ml : protection assurée). Un mois après la vaccination avec le TdPolio, 100% des sujets ont un titre en anticorps $\geq 0,1$ UI/ml, et 99,2% ont un titre ≥ 1 UI/ml (protection à long terme). Au total, 25,2% des sujets ont présenté une séroconversion.

Pour ce qui concerne une protection contre la poliomyélite la majorité des sujets étaient séropositifs en ce qui concerne les trois types de poliovirus. Au total, 99,2% des sujets avaient un titre en anticorps ≥ 5 pour le type 1, 100% pour le type 2 et 97,6% pour le type 3. Un mois après la vaccination avec le TdPolio, 100% des sujets ont un titre ≥ 5 pour tous les types de poliovirus avec un titre minimum de 120 pour le type 1, 160 pour le type 2 et 80 pour le type 3. Au total, 63,1% des sujets ayant déjà un titre élevé en anticorps présentent une séroconversion.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus avec le TdPolio et ceux obtenus en combinant les vaccins de référence Td et VPI®, on obtient une réponse en anticorps équivalente.

Exemple 3 Innocuité et tolérabilité chez le jeune adulte

L'inocuité et la tolérabilité d'un vaccin TdPolio ont été déterminées parmi 1742 jeunes adultes. Chacun de ces sujets a reçu une dose de 0,5 ml injecté dans le muscle deltoïde gauche du vaccin présenté à l'exemple 1 (ADP : 5 Lf par dose). Les effets ont été évalués 15 minutes après vaccination. L'effet local, régional et systémique ont été évalués pendant le mois suivant la vaccination.

L'effet immédiat commun est l'apparition d'une rougeur au point d'injection (0,34% des sujets) et une douleur (0,11%).

Les effets communs locaux pendant le mois suivant la vaccination sont les suivants pour 66% des sujets : douleur (64,41%), rougeur au point d'injection (9,13%), et nodules sous-cutanés (3,33%) Ces effets indésirables apparaissent les 3 premiers jours suivant la vaccination et durent 2 à 3 jours. 0,86% des sujets ont aussi rapporté des événements d'œdème, d'inflammation, de migraine, d'engourdissement du bras, des contractions involontaires des muscles et une paraesthésie.

Les effets communs systémiques pendant le mois suivant la vaccination sont les suivants pour 18% des sujets : maux de tête (10,5%), nausées ou vomissements (2,75%), et malaises (2,41%). Aucun événement d'urticaire ou de démangeaison généralisé n'a été rapporté. Ces événements apparaissent les 3 premiers jours suivants la vaccination et durent 2 à 3 jours. Seul 0,23% des sujets ont une température dépassant $\geq 40^{\circ}\text{C}$ durant les 3 premiers jours suivant la vaccination.

Exemple 4 Innocuité et tolérabilité du TdPolio *versus* Td + Polio chez les jeunes personnes

Le vaccin TdPolio décrit à l'exemple 2 montre une excellente tolérabilité au cours de l'essai sur 508 jeunes adultes (exemple 2). Les résultats sont d'ailleurs comparables à ceux obtenus au cours de l'essai décrit à l'exemple 3.

En faisant la soustraction du pourcentage de sujets ayant eu au moins un signe local ou régional au site d'injection du placebo (14,8%) de ceux observés au site d'injection du vaccin Polio (36,5%), puis en additionnant ce pourcentage à celui observé au site d'injections du vaccin Td (66,7%), on observe une différence d'environ 8% sur l'apparition d'événements indésirables (88,4% vs 80,5%). Le

vaccin TdPolio est donc mieux toléré que l'administration simultanée des vaccins existants.

Exemple 5 Immunogénicité chez les personnes au-delà de 40 ans

5

L'immunogénicité et l'innocuité d'un vaccin TdPolio ont été déterminées pendant un essai clinique chez 113 sujets de plus de 40 ans (40 à 78 ans). Tous les sujets avaient reçu une primo-vaccination (3 doses pendant un an) contre la diphtérie, le tétanos et la poliomyélite, la dernière vaccination remontant respectivement à 32 ans (minimum 15 ans), 28 ans (minimum 10 ans) et 28 ans (minimum 10 ans).

Les sujets ont reçu une injection d'une dose de 0,5 ml du TdPolio décrit à l'exemple 1 (ADP 5Lf par dose) dans le muscle deltoïde droit, et 28 jours plus tard une deuxième injection dans le muscle gauche. Les anticorps anti-diphtérie, tétanos et poliomyélite ont été évalués à partir des sérums des sujets par test ELISA.

Les résultats montrent que seulement 50% des sujets étaient initialement protégés contre le tétanos, mettant ainsi en évidence le déclin de l'immunité. 83% des sujets étaient initialement séropositifs contre les poliovirus types 1, 2 et 3. Au jour 28 suivant la première vaccination, la proportion de sujets protégés contre la diphtérie, le tétanos et le poliovirus types 1, 2 et 3 était montée à 80,5%, 97,3% et 100%, respectivement. Au jour 56 suivant l'administration de la seconde dose, la proportion de sujets protégés contre la diphtérie, le tétanos et le poliovirus types 1, 2 and 3 était montée à 93,7%, 100% et 100%, respectivement.

Exemple 6 Inocuité et tolérabilité du TdPolio *versus* Td + Polio
chez les personnes au-delà de 40 ans

L'inocuité et la tolérabilité du vaccin TdPolio décrit à l'exemple 5 ont été évaluées. Les résultats montrent un profil de tolérabilité similaire à celui obtenu avec l'association Td + Polio. Le vaccin TdPolio induit cependant moins d'événements indésirables sérieux (moins de 1,8 pour 1000 injections).

Exemple 7 Vaccin rappel pour adultes d.T.Polio.PT.F-HA

On prépare une suspension vaccinale de 0,5 ml, avec ou sans conservateur, constituée de 5 Lf d'anatoxine diphtérique (ayant une pureté de 1700 Lf par mg

d'azote), 5 Lf d'anatoxine tétanique (ayant une pureté de 1200 Lf par mg d'azote), 40 UI, 8 UI et 32 UI d'antigène D (valeurs telles que déterminées par la méthode sigmoïde) respectivement pour les poliovirus inactivés du type 1, 2 et 3 ; 6 µg/ml d'anatoxine purifiée (PT) et 6 µg/ml de F-HA de *Bordetella pertussis*, 0,35 mg d'hydroxyde d'aluminium, et le reste étant constitué de milieu 199 de Hanks exempt de rouge de phénol et d'eau.

On peut aussi ajouter comme conservateur 2,5 µl de 2-phénoxyéthanol et 12,5 µg de formaldéhyde.

Les anatoxines diphtérique et tétanique, ainsi que les poliovirus inactivés ont été préparées comme décrit à l'exemple 1.

L'anatoxine de *B. pertussis* est préparée selon la méthode de Sekura *et al.* (J. Biol. Chem., 258, 14647-14651, 1993), détoxifiée selon un protocole modifié de Munoz *et al.* (Infect. Immun., 33, 820-826, 1981), puis préadsorbée sur un gel d'aluminium. La F-HA de *B. pertussis* est préparée par la méthode décrite à l'exemple 3 de EP 0242 302 puis préadsorbée sur un sel d'aluminium.

On mélange ensuite les antigènes immunogènes ci-dessus avec de l'hydroxyde d'aluminium, de l'eau, et le cas échéant avec les conservateurs. Pour ce faire, on stérilise le gel d'aluminium en présence d'eau, on ajuste le pH entre 5,6 et 6, on ajoute séquentiellement l'ADP, l'ATP et la PT et la F-HA de *B. pertussis*, on ajuste le pH à 6,8-7, on ajoute le milieu 199 de Hanks et les trois types de poliovirus, puis le cas échéant, on ajoute le 2-phénoxyéthanol et le formaldéhyde.

Exemple 8 Vaccin rappel pour adulte d.T.Polio.PT.F-HA.HBs

On prépare une suspension vaccinale de 0,5 ml, sans conservateur, constituée de 5 Lf d'anatoxine diphtérique (ayant une pureté de 1700 Lf par mg d'azote), 5 Lf d'anatoxine tétanique (ayant une pureté de 1200 Lf par mg d'azote), 40 UI, 8 UI et 32 UI d'antigène D respectivement pour les poliovirus inactivés du type 1, 2 et 3 ; 6 µg/ml d'anatoxine purifiée (PT) de *Bordetella pertussis*, 6 µg/ml de F-HA de *B. pertussis*, 5 µg/ml d'antigène HBs de l'hépatite B, 0,35 mg d'hydroxyde d'aluminium, et le reste étant constitué de milieu 199 de Hanks exempt de rouge de phénol et d'eau.

Les anatoxines diphtérique et tétanique, ainsi que les poliovirus inactivés ont été préparés comme décrit à l'exemple 1. La PT et la F-HA *B. pertussis* ont été préparées comme décrit à l'exemple 7.

5 L'antigène HBs a été préparé selon la méthode décrite dans le brevet EP 273 811 (Pasteur Vaccins). Il est stabilisé par une préadsorption sur un gel d'aluminium.

10 On mélange ensuite les antigènes immunogènes ci-dessus avec de l'hydroxyde d'aluminium et de l'eau. Pour ce faire, on stérilise le gel d'aluminium en présence d'eau, on ajuste le pH entre 5,6 et 6, on ajoute séquentiellement l'ADP, l'ATP et PT et la F-HA de *B. pertussis*, on ajuste le pH à 6,8 - 7, on ajoute le milieu 199 de Hanks et les trois types de poliovirus, on ajuste le pH à 6,8 si nécessaire, et on ajoute l'HBs.

15 Exemple 9 Vaccin rappel pour adultes d.T.Polio.PT.F-HA.HBs.HA

On prépare une suspension vaccinale de 0,5 ml, sans conservateur, constitué de 5 Lf d'anatoxine diphtérique (ayant une pureté de 1700 Lf par mg d'azote), 5 Lf d'anatoxine tétanique (ayant une pureté de 1200 Lf par mg d'azote), 40 UI, 8 UI et
20 32 UI d'antigène D respectivement pour les poliovirus inactivés du type 1, 2 et 3 ; 6 µg/ml d'anatoxine purifiée (PT) de *Bordetella pertussis*, 6 µg/ml de F-HA de *B. pertussis*, 5 µg/ml d'antigène HBs de l'hépatite B, 5 µg/ml de virus de l'hépatite A inactivé, 0,35 mg d'hydroxyde d'aluminium, et le reste étant constitué de milieu 199 de Hanks exempt de rouge de phénol et d'eau.

25

Les anatoxines diphtérique et tétanique, ainsi que les poliovirus inactivés ont été préparés comme décrit à l'exemple 1. La PT et la F-HA *B. pertussis* ont été préparées comme décrit à l'exemple 7. L'antigène HBs a été préparé comme décrit à l'exemple 8.

30

Le virus inactivé de l'hépatite A est préparé selon la méthode de Flehmig *et al.* (*supra*).

On mélange ensuite les antigènes immunogènes ci-dessus avec de l'hydroxyde d'aluminium, les conservateurs et de l'eau. Pour ce faire, on stérilise le gel d'aluminium en présence d'eau, on ajuste le pH entre 5,6 et 6, on ajoute séquentiellement l'ADP, l'ATP et la PT et la F-HA de *B. pertussis*, on ajuste le pH à
35

6,8 - 7, on ajoute le milieu 199 de Hanks et les trois types de poliovirus, on ajuste le pH à 6,8 si nécessaire, puis on ajoute séquentiellement l'HBs et le virus de l'hépatite A inactivé.

Revendications

1. Un vaccin comprenant :
 - 5 - moins de 1,2 mg par ml de sel d'aluminium, exprimé par rapport à l'atome Al^{3+} ,
 - des antigènes immunogènes provenant au moins du poliovirus, de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani*, et
 - 10 - une quantité d'anatoxine diphtérique utilisée comme antigène immunogène de *Corynebacterium diphtheriae* comprise entre 4-16 Lf par ml.
2. Un vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce que la quantité d'anatoxine diphtérique est de l'ordre de 10 Lf par ml.
- 15 3. Un vaccin selon la revendication 1 ou 2 dans lequel la quantité d'anatoxine tétanique est de l'ordre de 20 Lf par ml.
4. Un vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 comprenant en outre au moins un antigène choisi parmi les antigènes de *Bordetella pertussis*, de
20 l'hépatite A et de l'hépatite B.
5. Un vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour son utilisation en primo-vaccination et/ou en vaccination de rappel.
- 25 6. Un vaccin selon la revendication 5 destiné à minimiser les effets réactogènes et/ou allergiques induits par ces antigènes et/ou les sels d'aluminium.
7. L'utilisation d'un vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour la fabrication d'un médicament pour la protection d'un individu contre au moins le
30 poliovirus, *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani*.
8. Utilisation selon la revendication 7, pour la préparation d'au moins deux doses de vaccin destinées à être injectées séparément à un même sujet adulte dans un intervalle de temps compris entre 10 jours à 3 mois, ledit vaccin étant destiné à
35 minimiser les effets réactogènes et/ou allergiques induits par ces antigènes.
9. Kit pharmaceutique comprenant au moins 2 doses injectables d'un vaccin selon l'une des revendications 1 à 4.

- 5 10. Méthode de vaccination contre au moins le poliovirus, *Corynebacterium diphtheriae* et *Clostridium tetani* comprenant l'administration d'un vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
- 10 11. Méthode de primo-vaccination selon la revendication 10 dans laquelle le vaccin est administré par voie sous-cutanée profonde ou intramusculaire, de préférence par voie intramusculaire au niveau de la région deltoïde, en 3 doses dudit vaccin, de préférence de 0,5 ml, les deux premières doses étant administrées à un intervalle de 1 à 2 mois, la troisième dose étant administrée 6 à 12 mois après l'injection de la deuxième dose.
- 15 12. Méthode de vaccination de rappel selon la revendication 10 dans laquelle le vaccin est administré par voie sous-cutanée profonde ou intramusculaire, de préférence par voie intramusculaire au niveau de la région deltoïde, une ou deux doses dudit vaccin, de préférence de 0,5 ml, espacées d'au moins 1 mois.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02913

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/295

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPODOC WPI MEDLIN BIOSIS CA EMBASE LIFESC NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHEIFELE D.W. ET AL.: "Can reductions in diphtheria toxoid or aluminum content reduce the reactogenicity of booster doses of DPT vaccine?" IMMUNOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (OXFORD), vol. 5, 1995, pages 73-77, XP000891884 the whole document	1-10, 12
A	WO 98 00167 A (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) 8 January 1998 (1998-01-08) cited in the application the whole document	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2000

Date of mailing of the international search report

09/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02913

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUPTA R K ET AL: "Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects" VACCINE, vol. 13, no. 14, 1 October 1995 (1995-10-01), page 1263-1276 XP004057427 cited in the application the whole document ----	1-8
A	GALAZKA A M ET AL: "Immunization against diphtheria with special emphasis on immunization of adults" VACCINE, vol. 14, no. 9, 1 June 1996 (1996-06-01), page 845-857 XP004057610 cited in the application the whole document ----	1-8
A	MURDIN A D ET AL: "Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience" VACCINE, vol. 14, no. 8, 1 June 1996 (1996-06-01), page 735-746 XP004069556 cited in the application the whole document ----	1-8
A	WO 98 19702 A (SMITH KLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 14 May 1998 (1998-05-14) page 9 -page 10 ----	1-12
P,X	WO 99 13906 A (PASTEUR MERIEUX) 25 March 1999 (1999-03-25) page 36 -page 28 ----	1-10
P,X	WO 99 48525 A (SMITH KLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 30 September 1999 (1999-09-30) page 24 -page 28 ----	1-12
P,X	LAROCHE P ET AL: "The immunogenicity and safety of a new combined diphtheria, tetanus and poliomyelitis booster vaccine (Td-eIPV)." INFECTION JAN.-FEB., 1999, vol. 27, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 49-56, XP000891892 ISSN: 0300-8126 the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/ 02913

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims 10-12 concern a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02913

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9800167 A	08-01-1998	AU 714493 B AU 3251697 A CA 2259415 A CN 1228709 A EP 0914153 A PL 331007 A SI 9720050 A	06-01-2000 21-01-1998 08-01-1998 15-09-1999 12-05-1999 21-06-1999 31-12-1999
WO 9819702 A	14-05-1998	AU 710475 B AU 5319698 A BR 9712917 A CN 1236321 A CZ 9901640 A EP 0941117 A NO 992156 A PL 333127 A ZA 9709984 A	23-09-1999 29-05-1998 07-12-1999 24-11-1999 13-10-1999 15-09-1999 04-05-1999 22-11-1999 23-07-1998
WO 9913906 A	25-03-1999	AU 4707097 A	05-04-1999
WO 9948525 A	30-09-1999	AU 3417299 A	18-10-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Det. de Internationale No

PCT/FR 99/02913

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K39/295

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPODOC WPI MEDLIN BIOSIS CA EMBASE LIFESC NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SCHEIFELE D.W. ET AL.: "Can reductions in diphtheria toxoid or aluminum content reduce the reactogenicity of booster doses of DPT vaccine?" IMMUNOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES (OXFORD), vol. 5, 1995, pages 73-77, XP000891884 le document en entier	1-10,12
A	WO 98 00167 A (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED) 8 janvier 1998 (1998-01-08) cité dans la demande le document en entier	1-8
	--- -/-- ---	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. de internationale No

PCT/FR 99/02913

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GUPTA R K ET AL: "Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects" VACCINE, vol. 13, no. 14, 1 octobre 1995 (1995-10-01), page 1263-1276 XP004057427 cité dans la demande le document en entier ----	1-8
A	GALAZKA A M ET AL: "Immunization against diphtheria with special emphasis on immunization of adults" VACCINE, vol. 14, no. 9, 1 juin 1996 (1996-06-01), page 845-857 XP004057610 cité dans la demande le document en entier ----	1-8
A	MURDIN A D ET AL: "Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience" VACCINE, vol. 14, no. 8, 1 juin 1996 (1996-06-01), page 735-746 XP004069556 cité dans la demande le document en entier ----	1-8
A	WO 98 19702 A (SMITH KLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 14 mai 1998 (1998-05-14) page 9 -page 10 ----	1-12
P,X	WO 99 13906 A (PASTEUR MERIEUX) 25 mars 1999 (1999-03-25) page 36 -page 28 ----	1-10
P,X	WO 99 48525 A (SMITH KLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 30 septembre 1999 (1999-09-30) page 24 -page 28 ----	1-12
P,X	LAROCHE P ET AL: "The immunogenicity and safety of a new combined diphtheria, tetanus and poliomyelitis booster vaccine (Td-eIPV)." INFECTION JAN.-FEB., 1999, vol. 27, no. 1, janvier 1999 (1999-01), pages 49-56, XP000891892 ISSN: 0300-8126 le document en entier -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 99/02913

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 10-12 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. .Je internationale No

PCT/FR 99/02913

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9800167 A	08-01-1998	AU 714493 B AU 3251697 A CA 2259415 A CN 1228709 A EP 0914153 A PL 331007 A SI 9720050 A	06-01-2000 21-01-1998 08-01-1998 15-09-1999 12-05-1999 21-06-1999 31-12-1999
WO 9819702 A	14-05-1998	AU 710475 B AU 5319698 A BR 9712917 A CN 1236321 A CZ 9901640 A EP 0941117 A NO 992156 A PL 333127 A ZA 9709984 A	23-09-1999 29-05-1998 07-12-1999 24-11-1999 13-10-1999 15-09-1999 04-05-1999 22-11-1999 23-07-1998
WO 9913906 A	25-03-1999	AU 4707097 A	05-04-1999
WO 9948525 A	30-09-1999	AU 3417299 A	18-10-1999